

半胱氨酰亚砷裂解酶（CSL）检测试剂盒（微量法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

半胱氨酰亚砷裂解酶（CSL）广泛存在于百合科葱属(如大蒜和洋葱)，十字花科芸薹属(如卷心菜，菜花，西兰花)，以及豆科中的合金欢属中，并通常被称为蒜氨酸酶(Alliinase)。香菇酸在 γ -谷氨酰转肽酶和半胱氨酰亚砷裂解酶的作用下转化成香菇精，以及产生丙酮酸、乙醛、甲醛和 NH_3 。CSL 是内源性甲醛生成的关键酶之一，测定 CSL 活性对于研究食品安全具有重要意义。

测定原理：

CSL 催化 S-甲基-L-半胱氨酸亚砷反应产生丙酮酸，与 2,4-二硝基苯肼反应，在碱性条件下显棕红色，在 510nm 下有特征吸收峰。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：粉剂×1 瓶，4℃ 避光保存，临用前加入 2mL 水溶解，用不完的试剂分装后-20℃ 保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃ 避光保存，临用前加入 10mL 水溶解，用不完的试剂分装后-20℃ 保存；

试剂三：液体 15mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂四：液体 6mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂五：液体 30mL×1 瓶，4℃ 保存。

样本处理：

按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆，4℃ 浸提 40min。12000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤:

	对照管	测定管
样品 (μL)	50	50
试剂一 (μL)		25
蒸馏水 (μL)	25	
试剂二 (μL)	25	25
充分混匀, 37°C 反应 20min		
试剂三 (μL)	100	100
试剂四 (μL)	50	50
充分混匀, 室温反应 5min		
试剂五 (μL)	250	250
充分混匀, 静置 5min, 吸取 200μL 至 96 孔板, 测定 510nm 处吸光值, 记为 A 对照和 A 测定, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管设一个对照管。		

计算公式:

标准曲线: $y = 0.7313x + 0.0027$, $R^2 = 0.9993$; x 为标准品浓度: $\mu\text{mol/mL}$; y 为吸光度 ΔA

1. 按蛋白含量计算

$$\begin{aligned} \text{C-S lyase 活性 } (\mu\text{mol/min/mg prot}) &= (\Delta A - 0.0027) \div 0.7313 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 0.068 \times (\Delta A - 0.0027) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{C-S lyase 活性 } (\mu\text{mol/min/g 鲜重}) &= (\Delta A - 0.0027) \div 0.7313 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 0.068 \times (\Delta A - 0.0027) \div W \end{aligned}$$

V 样, 加入样本上清体积, 0.05mL;

V 样总: 加入提取液体积, 1mL;

Cpr: 蛋白浓度, mg/mL;

W: 样本质量, g;

T, 反应时间, 20min。

注意事项:

若测定结果中吸光值超过 1, 请将样本稀释后进行测定, 并在计算公式中乘以稀释倍数。香菇类样本活性较大, 可能需要稀释 80-100 倍。